

Desenvolvimento de um Protocolo para a Otimização da Termorresistência de Proteínas de Aplicação Biotecnológica e Industrial

Nepomuceno, F.; Verli, H.

Laboratório de Bioinformática Estrutural
Centro de Biotecnologia - UFRGS, Porto Alegre, RS
<http://www.ufrgs.br/bioinfo>



Introdução

O uso industrial e biotecnológico de enzimas é diretamente influenciado pela sensibilidade destas moléculas a ambientes extremos. A fim de contornar esta limitação, é feita a busca por organismos extremofílicos, cujos aparatos moleculares apresentariam maiores chances de resistência a esses ambientes. Uma alternativa a essa estratégia é a engenharia de proteínas, buscando alterar as propriedades das mesmas a fim de resistirem ambientes extremos[1].

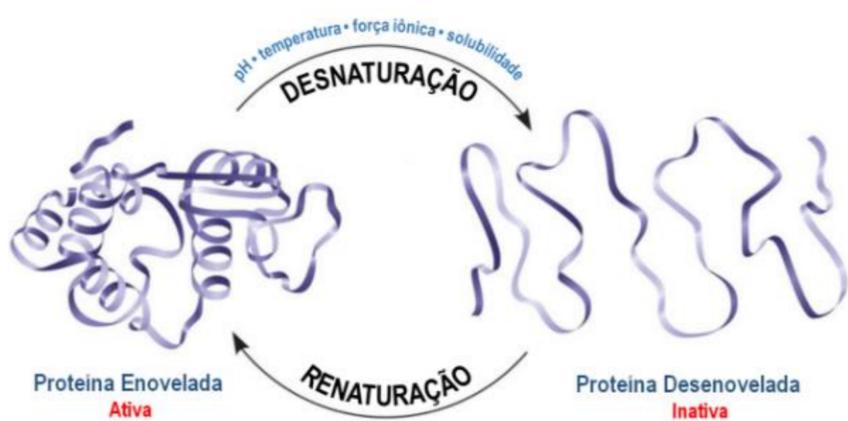


Figura 1: Esquema mostrando o processo de desnaturação e renaturação (Perda de função)

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um protocolo computacional que permita um aumento da termorresistência de proteínas de interesse, utilizando dinâmicas moleculares como ferramenta de estudo do comportamento dos modelos, análises de desnaturação e mutações pontuais.

Métodos

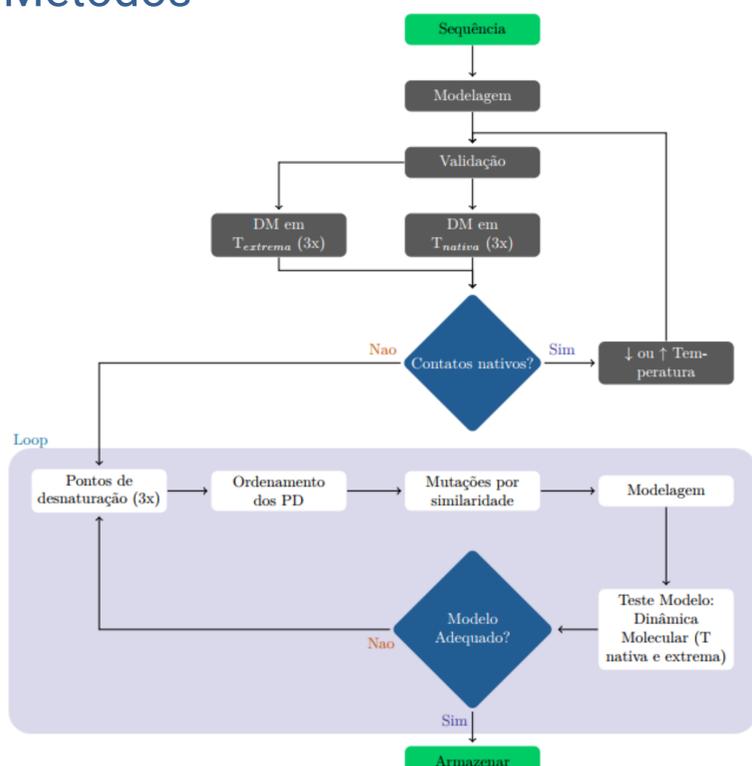


Figura 2: Esquema representando a metodologia utilizada para o desenvolvimento de um protocolo de desnaturação proteica. Os modelos escolhidos (Papaína[2], Estafopapaína[3], Papaína mutada[4]) foram submetidos a diferentes passos de dinâmica[5] sob diferentes temperaturas do sistema.

Resultados

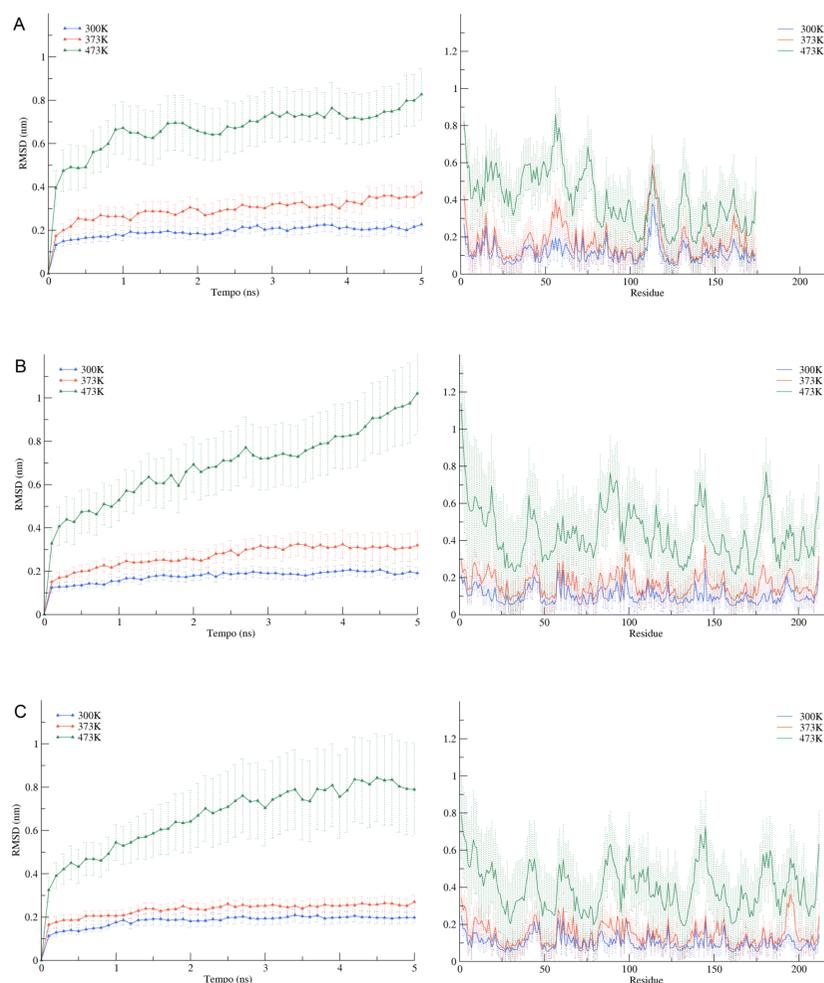


Figura 3: Análises de RMSD e RMSF de cada um dos modelos simulados, em triplicate, sob três temperaturas diferentes: 300K, 373K e 473K. (A) Estafopapaína (CodPDB: 1CV8). (B) Papaína (CodPDB: 1CVZ). (C) Papaína mutada (K174R/V32S/G36S).

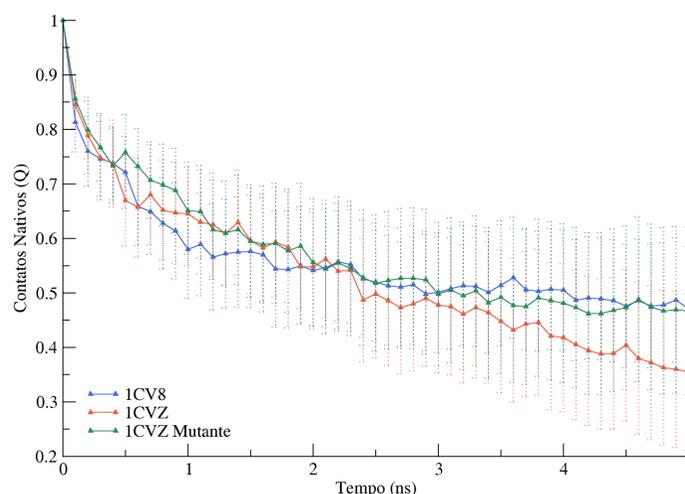


Figure 4: Análise da fração de contatos nativos ao longo do tempo de dinâmica a 473K para cada um dos modelos simulados.

Conclusões

- O trabalho atingiu o objetivo maior de criar um protocolo que realize, de maneira automática e através de dinâmicas moleculares, a identificação de desnaturação.
- Observou-se desnaturação de todos os modelos submetidos a 473K.
- A diferença de termorresistência dos modelos não foi evidenciada pelos contatos nativos.

Perpectivas

- Realizar simulações de dinâmica molecular a uma temperatura intermediária, entre 373K e 473K.
- Término do protocol automatizado, onde será possível inserir um cristal proteico e obter modelos termorresistentes como retorno.

Referências

- [1] Dedavid e Silva, L.A. MSc dissert, UFRGS, 2013
- [2] BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research, Oxford University Press, v. 28, n. 1, p. 235–242 jan 2000.
- [3] TSUGE, H. et al. Inhibition Mechanism of Cathepsin L-Specific Inhibitors Based on the Crystal Structure of Papain-CLIK148 Complex. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 266, n. 2, p. 411–416, dec 1999.
- [4] Hofmann, B., Schomburg, D., Hecht, H. Crystal Structure of a Thiol Proteinase from Staphylococcus Aureus V-8 in the E-64 Inhibitor Complex. Acta Crystallography, Sect A 49, p. 102, 1993.
- [5] Abraham, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. (2015) SoftwareX 1-2 19-25